

HELSINGIN YLIOPISTO

ELÄINLÄÄKETIETEELLINEN TIEDEKUNTA

ELÄINLÄÄKETIETEELLISTEN BIOTIETEIDEN OSASTO

FYSIOLOGIAN OPPIAINE

SYVENTÄVÄT OPINNOT

ISLANNINHEVOSTEN LAKTAATTIKULJETTAJAT PUNASOLUISSA

CECILIA BLOMGREN

Tiedekunta - Fakultet – Faculty

Eläinlääketieteellinen tiedekunta

Osasto - Avdelning – Department

Kliinisen hevos- ja pieneläinlääketieteen osasto

Tekijä - Författare – Author

Cecilia Blomgren

Työn nimi - Arbetets titel – Title

Islanninhevosten laktaattikuljettajat punasoluissa

Oppiaine - Läroämne – Subject

Fysiologian oppiaine

Työn laji - Arbetets art – Level

Syventävät opinnot

Alkuperäistutkimuksen sisältävä lissensiaatin tutkielma

Aika - Datum - Month and year

24.04.2014

Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages

33

Tiivistelmä - Referat – Abstract

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli saada tietoa laktaattia kuljettavien proteiinien ilmentymisestä islanninhevosten punasoluissa. Laktaattia muodostuu kovan liikuntarasituksen aikana lihaksissa, josta se kulkeutuu plasmaan. Monokarboksylaattikuljettajat (MCT) ilmentyvät punasolun solukalvolla ja kuljettavat osan laktaatista punasolun sisään. Rasituksen jälkeen MCT –proteiinit kuljettavat laktaatin punasolujen sisältä takaisin plasmaan, mistä se kulkeutuu edelleen muiden

kudosten käytettäväksi. Hevosien punasolusta on aikaisemmin löydetty kaksi MCT isoformia MCT1 ja MCT2, sekä MCT1 apuproteiinina toimiva CD147.

Islanninhevoset ovat pitkään olleet eristäytyneitä muista hevosroduista, ja siksi geeniperimä on pysynyt rodun sisällä samana ainakin viimeisen tuhannen vuoden ajan. Muilla hevosroduilla on tunnistettu kaksi eri ilmenemistasoa punasolujen laktaattia kuljettavassa MCT1 (MCT1-proteiinissa). Korkean MCT1 –ilmenemistason hevosilla on rasituksen aikana todettu jopa puolet laktaatista olevan punasolujen sisällä väliaikaisesti ”varastoituna”. Näin lihasten laktaatintuotanto voi jatkua pidempään ja korkean MCT1 –ilmenemistason hevosilla on spekuloitu olevan parempi suorituskky verrattuna matalan ilmenemistason hevosiin.

Islanninhevosten punasolujen laktaattikuljettajista ei ole aikaisempaa tietoa. Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää onko myös islanninhevosella kaksi MCT1 ilmenemistasoa. Tämän tiedon avulla pystytään arvioimaan milloin hevosten geeniperimään on tullut laktaattikuljetusproteiinin ilmenemistasoon vaikuttava mutaatio. Mikäli myös islanninhevosilla on kaksi ryhmää, voitaisiin olettaa että hevoset ryhmiin jakava geeneettinen tekijä on syntynyt jo ennen kuin islanninhevoset ovat jääneet eristykseen Islannin saarelle.

Tässä tutkimuksessa oli mukana 29 Suomessa asuvaa islanninhevosta, joiden ikävaihtelu oli 4-24 vuotta. Mukana oli ruunia, tammoja ja yksi ori. Hevosista otettiin verinäytteet kaulalaskimosta. Punasolut eroteltiin plasmasta ja punasolumembraanit eristettiin. Membraaneista mitattiin MCT1-, MCT2- ja CD147-proteiinipitoisuudet hevosspesifisten vasta-aineiden avulla käyttämällä western-blot menetelmää.

Tulokset olivat suurin piirtein samankaltaiset verrattuna muihin tutkimuksiin. Odotetusti todettiin korrelaatio MCT1 ja CD147 välillä. MCT1 ei jakaantunut yhtä kaksihuippuisesti verrattuna muihin tutkittuihin hevosrotuihin. CD147 kohdalla prosentuaalisesti enemmän hevosia asettui keskitasoryhmään. MCT2 oli sen sijaan jakautunut normaalisti, kuten myös muilla roduilla. MCT2 korreloi iän kanssa, mutta havainto on todennäköisesti harha, johtuen pienen otannan takia.

Avainsanat - Nyckelord - Keywords

Laktaatti, monokarboxylaattikuljettaja, MCT, CD147, punasolu, islanninhevon

Säilytyspaikka - Förvaringställe - Where deposited

Eläinlääke- ja elintarviketieteiden (EE) -talon Oppimiskeskus

**Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) - Instruktör och ledare -
Director and Supervisor(s)**

Johtaja Riitta Tulamo

Ohjaajat Anna Mykkänen ja Ninna Koho

1 JOHDANTO

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 Laktaatin muodostus lihaksessa

2.1.1 ATP:n muodostus oksidatiivisen fosforylaation kautta

2.1.2 ATP:n muodostus anaerobisen glykolyysin kautta

2.1.3 Lihassolutyyppien vaikutus laktaatin muodostukseen

2.2 Laktaatin vaikutus lihaksessa ja muualla elimistössä

2.3 Laktaatin kuljetus

2.3.1 Hevosten väliset erot laktaatin kuljetuksessa punasoluihin

2.3.2 Hevosrotujen väliset erot

2.3.3 Hevosten laktaatinkuljetus punasoluihin verrattuna muihin eläinlajeihin

2.4 Monokarboksylaattikuljettajaperhe

2.4.1 MCT1

2.4.2 MCT2

2.4.3 MCT4

2.4.4 Apuproteiini CD147

2.5 Islanninhevoset

3 TUTKIMUSOSIO

3.1 Aineisto

3.2 Näytteiden keräys ja käsittely

3.3 Menetelmät

3.3.1 Punasolujen pesu ja membraanien (ghost) valmistus

3.3.4 Western blot

3.3.5 Blottaus, eli proteiinen siirto membraanille

3.3.6 Ponceau- värjäys

3.3.7 Blokkauk

3.3.9 Kvanttaminen

3.3.10 Statiikka

4 TULOKSET

5 POHDINTA

6 KIITOKSET

7 KIRJALLISUUSVIITTEET

1 JOHDANTO

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli saada tietoa laktaattia kuljettavien proteiinien ilmentymisestä islanninhevosten punasoluissa. Laktaattia muodostuu kovan liikuntarasituksen aikana lihaksissa, joista se kulkeutuu plasmaan. Monokarboksylaattikuljettajat (MCT) ilmentyvät punasolun solukalvolla ja kuljettavat osan laktaatista punasolun sisään. Rasituksen jälkeen MCT – proteiinit kuljettavat laktaatin punasolujen sisältä takaisin plasmaan, mistä se kulkeutuu edelleen muiden kudosten käytettäväksi. Hevosen punasolusta on aikaisemmin löydetty kaksi MCT isoformia MCT1 ja MCT2, sekä MCT1:n apuproteiinina toimiva CD147.

Islanninhevoset ovat pitkään olleet eristäytyneitä muista hevosroduista, ja siksi geeniperimä on pysynyt rodun sisällä samana ainakin viimeisen tuhannen vuoden ajan. Muilla hevosroduilla on tunnistettu kaksi eri ilmenemistasoa punasolujen laktaattia kuljettavassa MCT1-proteiinissa. Korkean MCT1 –ilmenemistason hevosilla on rasituksen aikana todettu jopa puolet laktaatista olevan punasolujen sisällä väliaikaisesti ”varastoituna”. Näin lihasten laktaatintuotanto voi jatkua pidempään ja korkean MCT1 –ilmenemistason hevosilla on spekuloitu olevan parempi suorituskky verrattuna matalan ilmenemistason hevosiin.

Islanninhevosten punasolujen laktaattikuljettajista ei ole aikaisempaa tietoa. Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää onko myös islanninhevosella kaksi MCT1 -ilmenemistasoa. Tämän tiedon avulla pystytään arvioimaan milloin hevosten geeniperimään on tullut laktaattikuljetusproteiinin ilmenemistasoon vaikuttava mutaatio. Mikäli myös islanninhevosilla on kaksi ryhmää, voitaisiin olettaa että hevoset ryhmiin jakava geeneettinen tekijä on syntynyt jo ennen kuin islanninhevoset ovat jääneet eristyksiin Islannin saarelle.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 Laktaatin muodostus lihaksessa

2.1.1 ATP:n muodostus oksidatiivisen fosforylaation kautta

Kevyessä liikunnassa aerobinen energiatuotanto on hallitseva ja riittää tyydyttämään lihaksen energiantarpeen. Lihaskiitos saa energiansa glykogeenivarastoista sekä verenkierrossa olevista vapaista rasvahapoista ja glukoosista. Glykogeeni pilkkoutuu glykogenolyyssissä glukoosiksi, joka muutetaan glykolyysin avulla pyruvaatiksi (Billeter ja Hoppeler 1992). Pyruvaatti siirtyy mitokondrioon, jossa toimii Krebsin sykli. Krebsin sykli tuottaa adenosiinitrifosfaattia eli ATP:tä, hiilidioksidia sekä elektroninsiirtäjiä (NADH, FADH₂), joita tarvitaan pelkistäjiksi oksidatiiviseen fosforylaatioon. Oksidatiivisessa fosforylaatiossa elektroninsiirtäjien elektronit siirretään hengitysketjua myöten hapelle, jolloin syntyy runsaasti ATP:tä. ATP toimii lihasten energialähteenä. Soluhengitys (glykolyysi, Krebsin sykli ja oksidatiivinen fosforylaatio) on tehokas, mutta hidas tapa tuottaa energiaa verrattuna anaerobiseen energiatuotantoon. Yhtä glukoosimolekyyliä kohti saadaan teoriassa 30 ATP-molekyyliä (Berg ym. 2002).

Hapen saanti ja sen käyttökyky ovat kuitenkin rajoittavia tekijöitä aerobisessa energiatuotannossa. Hengitystie-elimistön täytyy toimia tehokkaasti, jotta veri saadaan hapetettua keuhkoissa. Sydämen ja verenkiertoelimistön tehtävänä on kuljettaa hapettunut veri tehokkaasti lihasten hyödynnettäväksi. Myös veren hemoglobiinimäärän täytyy olla tarpeeksi suuri riittävään hapenkuljetukseen. Hevosella perna toimii punasoluvälikamiona ja pernassa varastoituja punasoluja vapautuu rasituksen aikana katekoliamiinien vaikutuksesta verenkiertoon kasvattaen siten veren hapenkuljetuskykyä. Lihaksen runsas kapillaarisuonitus, myoglobiini ja runsas mitokondrioiden määrä lisäävät lihassolujen kykyä tuottaa energiaa aerobisesti (Pösö ym. 2002).

2.1.2 ATP:n muodostus anaerobisen glykolyysin kautta

Kovassa rasituksessa solun ATP:n tarve on isompi kuin mitä mitokondriot pystyvät tuottamaan, jolloin ATP:tä muodostuu myös anaerobisesti solun matriksissa glykolyysin avulla.

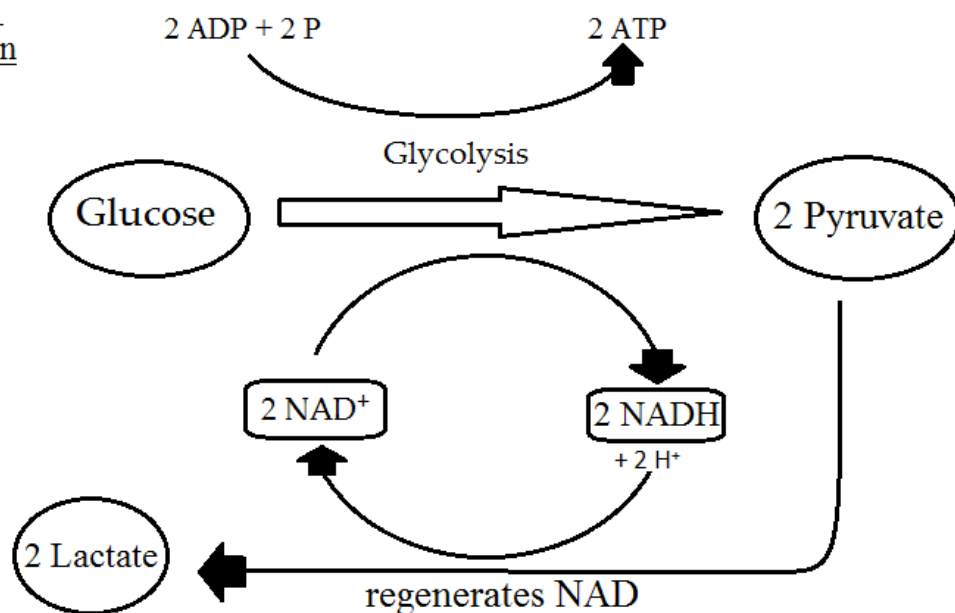
Energiatuotanto seuraa alussa samaa polkua riippumatta hapen saatavuudesta. Glykolyysi tapahtuu solun matriksissa ja glukoosi muuttuu pyruvaatiksi. Reaktio on anaerobinen.

Normaalitilanteessa, jossa happea on saatavilla, energiatuotanto jatkuu aerobisena. Pyruvaatti siirtyy mitokondrion sisään, ja muuttuu Krebsin syklissä asetyyli-CoA-molekyyliksi. Reaktion aikana NAD^+ pelkistyy NADHksi, jonka avulla ATP:tä tuotetaan oksidatiivisessa fosforylaatiossa.

Jos happea ei ole saatavilla, pyruvaatti pysyy solun matriksissa ja laktaattidehydrogenaasi-entsyymi muuttaa sen laktaatiksi, samalla vapauttaen 2 ATP- ja 2 NAD^+ molekyylejä. Tällä tavoin laktaattia muodostamalla varmistetaan glykolyysin jatkuminen (kuva 1) (Berg ym. 2002).

Anaerobiseen energiatuotantoon käytetään helposti ja nopeasti saatavia yhdisteitä, kuten verenkierrossa olevaa glukoosia ja lihasten omaa glykokeenivarastoa. Anaerobinen energiatuotanto on nopea, mutta tehoton, sillä se tuottaa yhdestä glukoosimolekyylistä vain 2 ATP-molekyylejä (Kuva 1) (Berg ym. 2002).

Lactic Acid Fermentation



Kuva 1: anaerobinen glykolyysi (Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported license-luvalla)

2.1.3 Lihassolutyyppien vaikutus laktaatin muodostukseen

Aerobinen kapasiteetti riippuu hevosrodusta, lihaksesta ja myös lihassolutyypistä (Pösö ym. 2002). Lihassolut jaetaan tyyppeihin I, IIA ja IIX. Jaottelu tapahtuu lihassolun morfologian ja aineenvaihdunnallisten ominaisuuksien perusteella. Tyyppi I lihassolut ovat hitaasti supistuvia ja oksidatiivisia lihassoluja. Tyyppi IIA lihassolut ovat nopeasti supistuvia lihasoluja, joilla on sekä oksidatiivista että glykolyyttistä kapasiteettia. Tyyppi IIX lihassolut ovat nopeasti supistuvia glykolyyttisiä lihasoluja (Authier 2000). Kaikki lihasolutyypit sisältävät laktaattidehydrogenaasia, mutta eniten sitä löytyy tyyppi IIX lihasoluista. Niissä on myös muihin tyyppeihin verrattuna enemmän solunsisäistä glykokeenia, vähemmän mitokondrioita ja vähemmän hiusverisuonitusta lihasyiden välillä (Pösö ym. 2002). Tyyppi IIX lihasolujen laktaattidehydrogenaasi-entsyymi on isoentsyymi, joka suosii reaktiota jonka lopputuote on laktaatti. Hitaasti supistavissa lihasoluissa on myös reaktion toista suuntaa suosivaa laktaattidehydrogenaasi-isoentsyymiä, eli se muuttaa mieluummin laktaattia pyruvaatiksi (Pösö ym. 2002).

2.2 Laktaatin vaikutus lihaksessa ja elimistössä

Elimistön neutraalissa ympäristössä lihaksessa muodostuva maitohappomolekyyli hajoaa negatiiviseksi laktaatti-anioniksi sekä positiiviseksi protoniksi (Sjaastad ym. 2003). Protonit aiheuttavat pH:n laskun ja anaerobisen liikunnan aikana lihas happamoituu, mikä osaltaan edesauttaa lihasten väsymistä. Lihasolujen sytosolin happamoituminen vähentää myosiini-päiden ATPaasi-aktiivisuutta, ja lihaskontraktio heikkenee (Sjaastad ym. 2003). Lihakset hidastavat happamoitumista erilaisilla puskureilla, kuten karnosiinilla (Pösö ym. 2002).

Laktaatin vaikutusta lihaksen toimivuuteen on tutkittu monessa eri tutkimuksessa. Tutkijat ovat inkuboineet lihaskudosta laktaatissa levossa ja lihastyön aikana. Tutkimuksien mukaan laktaatissa inkuboitunut lihas väsy nopeammin kuin kontrollilihaskudosnäytteet (Bangsbo ja Juel 2006). On myös todettu että laktaatti-ioni vähentää lihaksien supistusvoimaa jopa 15 % riippumatta pH:sta (Hogan ym. 1999). Toisaalta paljaat lihassyöt eivät reagoi samalla tavalla laktaattiin, joten arvioidaan, että laktaatti vaikuttaa lihaksen toimivuuteen lihasmembraanin kautta (Bangsbo ja Juel 2006). Laktaatti myös vaikuttaa intrasellulaariseen Ca^{2+} -ionin kuljetukseen lihasaktivaation aikana.

On todettu että laktaatti ja H^+ -ioni estävät Ca^{2+} -ionin vapautumista sarkoplasmaattisesta kalvostosta (Bangsbo ja Juel 2006).

Kovan rasituksen aikana maitohapon muodostus alentaa veren pH:ta, jolloin syntyy metabolinen asidoosi. Keuhkot reagoivat korkeampaan H^+ -pitoisuuteen tehostamalla ventilaatiota, ja pyrkivät siten palauttamaan elimistön pH:n lähelle normaalia (Sjaastaad ym. 2003). Lihaksen pH on levossa 7,08 verrattuna 6,60 rasituksessa (Sahlin ym. 1976). Veren pH laskee vastaavasti, levossa se on 7,40 ja rasituksessa 7,07 (Bayly ym. 1983).

2.3 Laktaatin kuljetus

Luurankolihas on elimistön pääasiallinen laktaatin tuottaja (Väihkönen ym 1998). Mitä enemmän laktaattia muodostuu, sitä enemmän lihasolujen sytoplasma happamoituu, ja lihakset väsyvät. Lihasten toiminnan kannalta onkin keskeistä, että laktaatti kulkeutuu nopeasti lihaksesta plasmiaan. Jos laktaatin konsentraatio plasmassa nousee liian korkeaksi, laktaatin kuljetus lihaksesta hidastuu, koska konsentraatioero plasman ja sytoplasman välillä pienenee. Laktaatti on kuljetettava plasmasta muihin kudoksiin, jotka voivat käyttää sitä energianlähteenään, tai varastoitava väliaikaisesti punasoluihin. Ihmisen punasolut pystyvät varastoimaan 30 % lihasten tuottamasta laktaatista liikunnan aikana (Skelton ym. 1995). Tämä väliaikainen säilytys punasoluissa lisää plasman kapasiteettia ottaa vastaan enemmän laktaattia lihaksesta (Väihkönen ym. 1998). Hevosilla punasolujen kyky varastoida laktaattia on ihmistä suurempi ja jopa puolet laktaatista voi olla tilapäisesti varastoituna punasoluihin rasituksen aikana (Väihkönen ym. 1998).

Vain non-dissosiotunut maitohappo-molekyyli voi vapaasti liikkua solukalvojen yli. Suurin osa maitohaposta on kuitenkin ioni-muodossa fysiologisessa pH:ssa (Pösö ym. 2002). Punasolumembraanilta on löydetty kaksi erilaista kuljetusmekanismia, monokarboxylaattikuljettaja-proteiini (MCT), ja anioninvaihtaja (band 3 proteiini). MCT-kuljettajaproteiini kuljettaa yhtä aikaa laktaatti-ionin ja protonin samansuuntaisesti solukalvon läpi. Anioninvaihtaja on anti-portaalinen ja vaihtaa laktaatti-molekyylin joko kloridi-ioniin tai karbonaatti-ioniin (HCO_3^-) (Väihkönen ym. 1998). Anioninvaihtajan tiedetään olevan toiminnaltaan paljon

hitaampi kuin monokarboxylaattikuljettajat ja siten sen merkitys liikunnan aikana on pieni (Skelton ym. 1995).

2.3.1 Hevosten väliset erot laktaatin kuljetuksessa punasoluihin

Hevoset voidaan jakaa kahteen ryhmään punasolujen laktaatinkuljetuskapasiteetin perusteella. Osalla hevosista on matala laktaatin kuljetusaktiivisuus (LT) ja osalla korkea aktiivisuus (HT). HT-ryhmän hevosten laktaatinkuljetus toimii pääsääntöisesti MCT-kuljettajaproteiinien avulla, kun taas LT-ryhmän hevosilla laktaatti diffundoituu lähinnä passiivisesti solukalvojen läpi ja pienessä määrin myös anionivaihtajan avulla (Väihkönen ym. 2001).

Väihkönen (1998) tutki lämminverihevosten laktaatinkuljetusta punasoluihin. Kuljettajaproteiinien toiminnan tutkimiseksi kokeessa inhiboitiin joko MCT-kuljettajaproteiinit tai anionivaihtajat. Suurin osa hevosista kuului HT-ryhmään, jonka punasolujen laktaatinkuljetuksesta noin 60-70% hoiti MCT-kuljettajaproteiinit. LT-ryhmällä sekä MCT-kuljettajaproteiinien että anionivaihtajien aktiivisuudet olivat alhaiset, eli tärkein mekanismi oli non-dissosiotuneen laktaatin diffuusio solukalvojen läpi. Näiden LT-ryhmän hevosten kokonaislaktaattikuljetus oli alhainen HT-ryhmän hevosiin verrattuna. Osalla hevosista (noin 13% hevosista) MCT-kuljettajaproteiinien aktiivisuus oli alhainen, mutta anionivaihtajien aktiivisuus oli sama verrattuna muihin hevosiin. Laktaatin kokonaiskuljetuskapasiteetti oli kuitenkin korkea eli ne kuuluivat HT-ryhmään (Väihkönen ym. 1998).

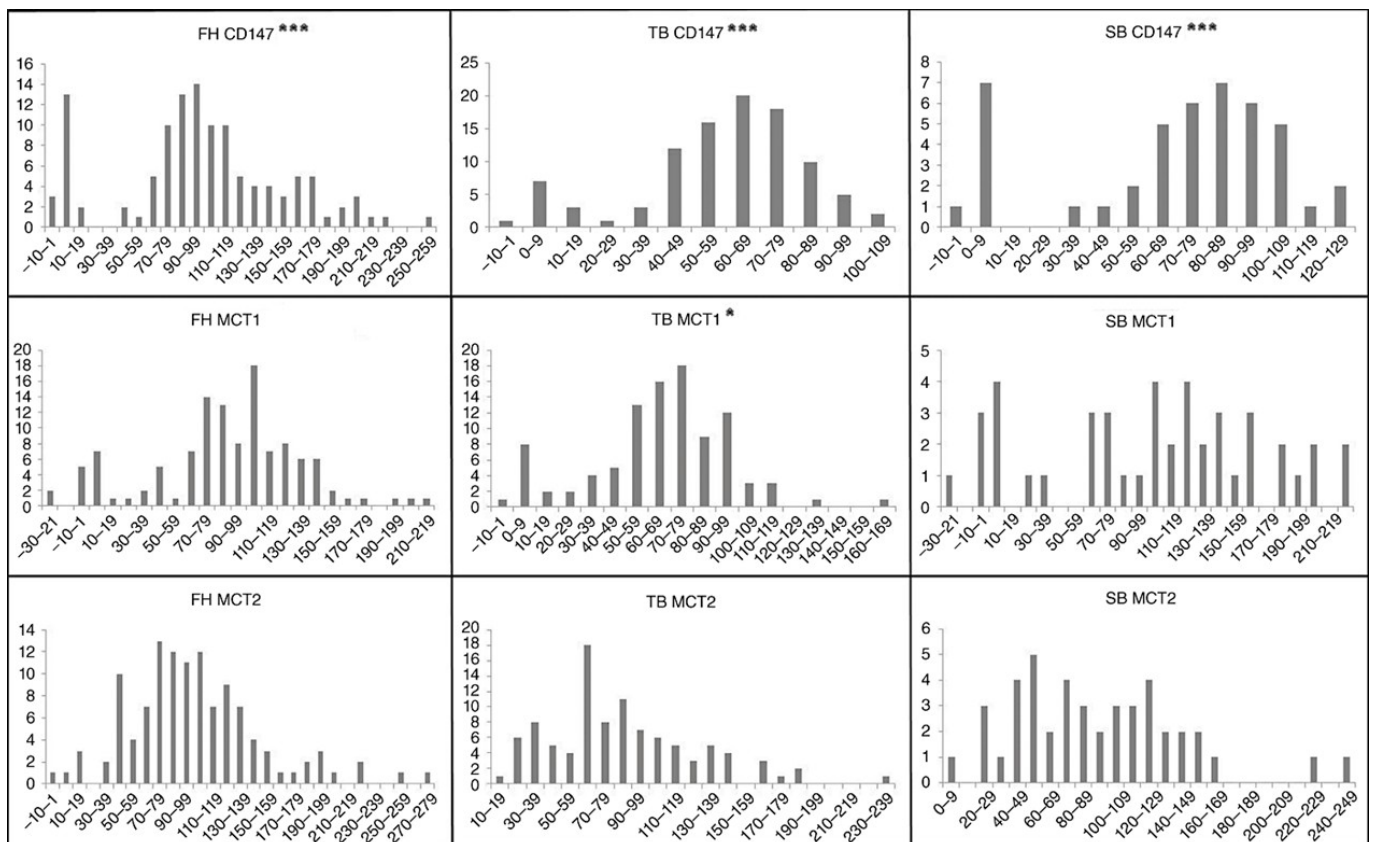
Tammojen laktaatinkuljetus punasoluihin oli suurempi verrattuna oreihin. Tutkimuksessa spekulointiin, että tämä voi johtua estrogeenin vaikutuksesta hiilihydraattimetaboliaan ja laktaatin muodostukseen (Väihkönen ym. 1998).

2.3.2 Hevosrotujen väliset erot

Mykkäsen (2010) tutkimuksessa verrattiin kolmen hevosrodun laktaattikuljetusta. Tutkittavat hevosrodut olivat täysverihevoset, lämminveriset ja suomenhevoset. Kaikista roduista CD147-proteiinin ilmentyminen oli selvästi jakautunut bimodaalisesti suomenhevosilla ja lämminverihevosilla. Suomenhevosilla HT-ryhmässä oli 85% ja lämminverisillä vastaavasti 82% koko tutkitusta hevosmäärästä (Kuva 2). Tulos on hieman yllättävä, koska suomenhevoset ovat olleet sprinttikaltaisessa kilpailukäytössä suhteessa vain lyhyen ajan verrattuna lämminverisiin ja täysveriisiin hevosiin (Mykkänen ym. 2010).

Täysverihevosilla CD147-proteiini jakautui myös bimodaalisesti. Jakauma oli selvästi siirtynyt HT-ryhmän puoleen. 88% täysverihevosista kuului HT-ryhmään, ja vain 11%:lla oli matala CD147-proteiinin ekspressoituminen ilmentyminen punasolukalvolla (kuva 2).

MCT1-proteiini seurasi myös bimodaalista jakaumaa, mutta oli statistisesti merkittävä vain täysverihevosilla. MCT2-proteiini oli jakautunut normaalisti kaikilla tutkituilla hevosroduilla (kuva 2) (Mykkänen ym. 2010).



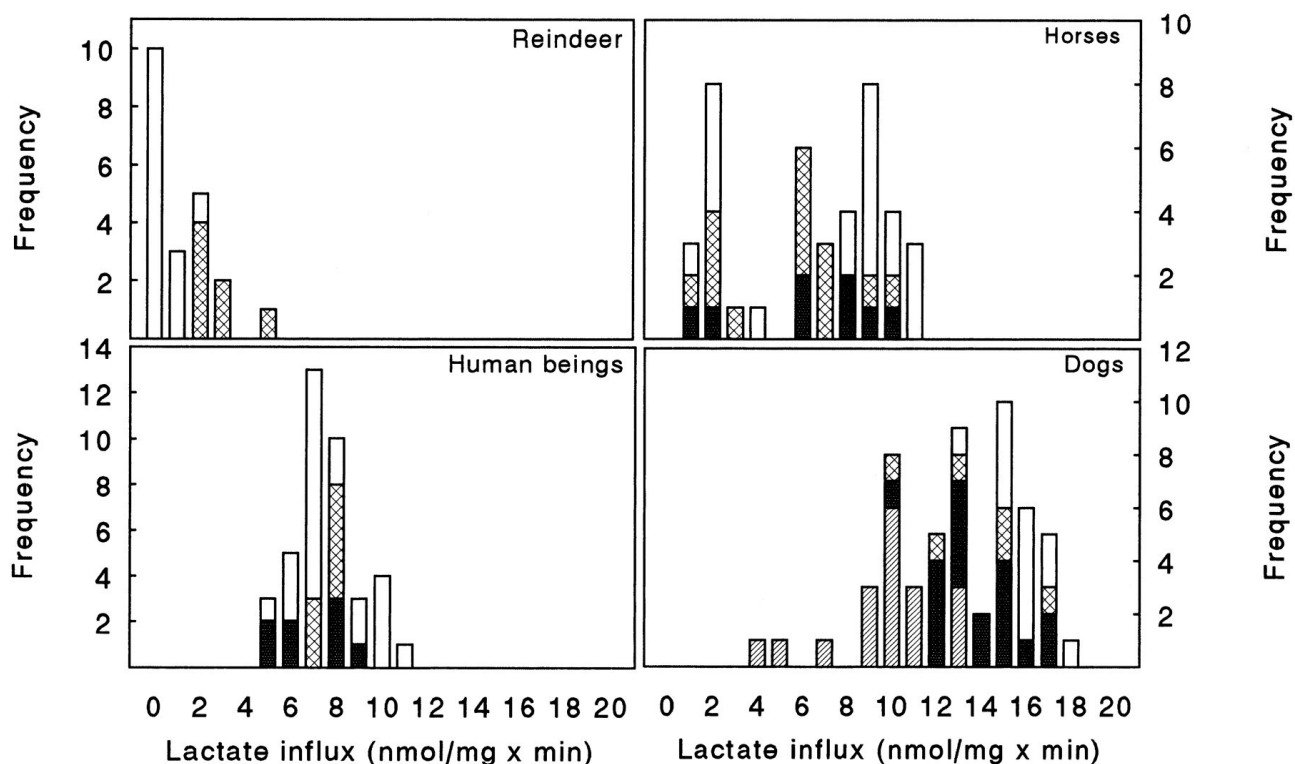
Kuva 2; MCT1, MCT2 ja CD147 punasolumembraaneilla (FH=suomenhevonen, TB=täysverinen, SB=lämminverinen) (Mykkänen 2010)

2.3.3. Hevosten laktaatinkuljetus punasoluihin verrattuna muihin eläinlajeihin

Eläinlajien välillä on eroja laktaatin kuljetuksessa punasoluihin. Tutkimuksien mukaan atleettisilla eläinlajeilla (esim. koira) laktaatin siirto plasmasta punasoluihin on paljon tehokkaampaa verrattuna non-atleettisiin eläinlajeihin. Atleettisilla eläinlajeilla laktaatin kuljetus punasoluihin tapahtui päänsäänöisesti monokarboksylaattikuljettajien kautta, kun taas non-atleettisilla eläinlajeilla kuljetus tapahtui myös osittain anioni-vaihtajalla (Skleton ym. 1995).

Myöhemmissä tutkimuksissa on kuitenkin esitetty, että laktaattikuljetuksen aktiivisuus ei ole yhteydessä lajin atleettisuuden kanssa. Esimerkiksi porojen MCT -proteiinit ovat joko inaktiivisia tai niitä ei esiinny ollenkaan punasolumembraaneilla. Porot ovat kuitenkin fysiologisesti erittäin aktiivisia ja kulkevat pitkiä matkoja väsymättä. Todennäköisempää on, että laktaattikuljetuksen aktiivisuus onkin yhteydessä muiden fysiologisten ominaisuuksien kanssa (Väihkönen ym. 2001).

Hevosten laktaatin kuljetuksen aktiivisuus jakautuu muihin eläinlajeihin verrattuna poikkeuksellisesti kaksihuippuisesti. Aktiivisuus on joko matala tai korkea. Muilla tutkituilla eläinlajeilla (koira, ihminen, poro) tulokset ovat normaalisti jakautuneet (Kuva 3; Väihkönen ym. 2001).



Kuva 3: Laktaattikuljetuksen aktiviteetit eläinlajeittain

2.4 Monokarboksylaattikuljettajaperhe

Jokaista glukoosimolekyyliä kohden glykolyysi tuottaa kaksi laktaattimolekyyliä. Laktaatin pKa on 3,86, mikä fysiologisessa happamuudessa tarkoittaa että laktaattimolekyyli hajoaa laktaatti-anioniksi ja protoniksi. Tämän takia laktaatti on kuljetettava nopeasti solusta ulos, jotta solunsisäinen pH ei laske liian alhaiseksi ja aiheuta glykolyysin pysähtymistä. Jotkut kudokset, kuten aivot, maksa ja sydän, käyttävät laktaattia energiatuotannossa, jolloin laktaattia on kuljettava nopeasti solujen sisään. Anioni-muodossa vesiliukoinen laktaatti ei pääse kulkemaan rasvaliukoisten solukalvojen läpi, vaan se tarvitsee kuljettaja-proteiinin (Halestrap ym. 1999).

Monokarboksylaatti-kuljettajat katalysoivat monokarboksylihappojen kuljetusta solukalvojen läpi (Halestrap 2012). Kuljetus ei vaadi ATP:tä, vaan H^+ -gradientti määrää kuljettajien toimintaa (Juel 2008).

Monokarboksylaatti-perheeseen (MCT) kuuluu ainakin 14 eri isoformia, jotka ovat spesifisiä eri kudostyypeille (Pösö ym 2002, Halestrap 2011). MCT-isoformeista ainakin MCT1-MCT4 pystyvät kuljettamaan maitohappoa (Halestrap 2011).

Rakenteeltaan proteiinit koostuvat 12 transmembraani-heliksistä joiden keskellä on iso silmukka membraanin intrasellullaari-puolella. C- ja N-terminaalit ovat myös molemmat intrasellullaarisia (Halestrap 2011).

2.4.1 MCT1

Monokarboksylaattikuljettajien perheestä MCT1-proteiinia on melkein kaikissa kudoksissa, ja kaikissa eläinlajeissa (Halestrap 2012, Koho 2006). Sen on pysynyt lähes muuttumattomana evoluution aikana. Esimerkiksi proteiinisekvenssi on ihmisellä ja rotalla 83 % osalta identtinen (Jackson ym. 1997).

MCT1 ei ole kovin substraattispesifinen. *In vivo* se kuljettaa laktaatin lisäksi muita karboksylihappoja kuten pyruvaatti, betahydroksibutyyraatti, ja asetoasetaatti. Kokeellisesti on myös todistettu, että se voi siirtää lyhytketjuisia rasvahappoja kuten propionaatti ja butyyraatti. On kuitenkin mielenkiintoista, että laktaatin suhteen MCT1 on stereoselektiivinen. Se siirtää L-laktaattia huomattavasti paremmin kuin D-laktaattia (Halestrap 2012).

Laktaattikuljetuksen suunnan määrää protonigradientti membraanin eri puolilla (Halestrap 2011). Lihaskudoksessa MCT1 kuljettaa laktaattia verestä punaisten lihasolujen sisään, mutta myös valkoisista lihassoluista vereen. Punaisilla lihassoluilla on paljon mitokondrioita, ja siten myös korkea oksidatiivinen kyky, verrattuna valkoisiin lihasoluihin, jolla on taas korkea glykolyttinen kapasiteetti. Punaiset lihasolut käyttävät siten valkoisten lihasolujen tuottamaa laktaattia energialähteenään (McCullagh ym. 1996).

Protoni sitoutuu MCT1-kompleksin Lys38 aminohappoon. Tämä aiheuttaa kanavan avautumisen membraanin ekstrasellulaarispuolella. Negatiivisesti varautunut laktaatti-ioni sitoutuu Lys38 kanssa. Protoni siirtyy Lys38:sta seuraavaan aminohappoon Asp302 ja laktaatti-ioni siirtyy mukaan. Tällä tavalla protoni siirtyy aminohaposta toiseen ja laktaatti-ioni seuraa mukaan. Lopulta MCT1-kompleksi rentoutuu takaisin suljettuun muodostelmaan, jolloin laktaatti pääsee vapaaksi membraanin intrasellulaariselta puolelta (Manoharan ym. 2006).

Tutkimuksien mukaan hevosen MCT1- proteiini vaatii toimiakseen apuproteiinin, CD147 (Koho ym. 2006). MCT1 muodostaa CD147 proteiinin kanssa kompleksin solukalvolla (Kuva 4). Kompleksiin kuuluu kaksi MCT1 ja kaksi CD147 molekyyliä. Mikäli CD147 proteiinin ilmentyminen estetään, toimivaa kuljettajakompleksia ei muodostu (Wilson ym. 2000).

2.4.2 MCT2

MCT2 proteiinisekvenssi ei ole pysynyt yhtä muuttumattomana evoluution aikana kuin MCT1:n. Identtisyys rotan ja ihmisen välillä on vain 65 % (Jackson ym. 1997).

MCT2 ekspressoituu myös vähemmän kuin MCT1 (Halestrap 2011) ja on hyvin laji- ja kudosspesifinen (Garcia ym 1995). MCT2:lla on korkeampi affiniteetti laktaatille verrattuna MCT1:een (Halestrap 2011). Sioilla, joiden lihakset ovat glykolyttiset, MCT2 on pääasiallinen kuljettaja MCT4 kanssa (Koho ym. 2006). MCT2-proteiinin kaitsijaproteiinia ei toistaiseksi ole pystytty tunnistamaan (Wilson ym. 2000) .

Aikasempien hevosilla tehtyjen tutkimusten mukaan hevosten punasolukalvoissa esiintyy sekä MCT1- että MCT2-proteiineja. Hevonen on ainoa laji tähän mennessä, jolla MCT2 on löydetty punasolujen membraanista (Mykkänen ym. 2010).

Kaikilta tähän mennessä tutkituilta hevosroduilta MCT1 ja MCT2 proteiineja on löydetty (Mykkänen ym. 2010).

2.4.3 MCT 4

MCT4 on monokarboksylikuljettaja, joka esiintyy erityisesti valkoisissa lihassyissä, joissa se kuljettaa laktaattia solusta ulos verenkiertoon. MCT4:tä on myös astrosyyteissä, kondrosyyteissä ja valkosoluissa. Kuten MCT1:n, myös MCT4 tarvitsee apuproteiinin, CD147, asettuakseen oikeaan asentoon solukalvolla. Tutkimuksessa on todettu että MCT4-proteiinia esiintyy nuorten rottien sydänlihaksessa, mutta määrä vähenee iän myötä, kunnes se on lähes kokonaan hävinnyt aikuisiässä. Tämä myös viittaa siihen että MCT4 on erikoistunut kuljettamaan glykolyysin tuottamaa laktaattia ulos soluista (Halestrap 2012).

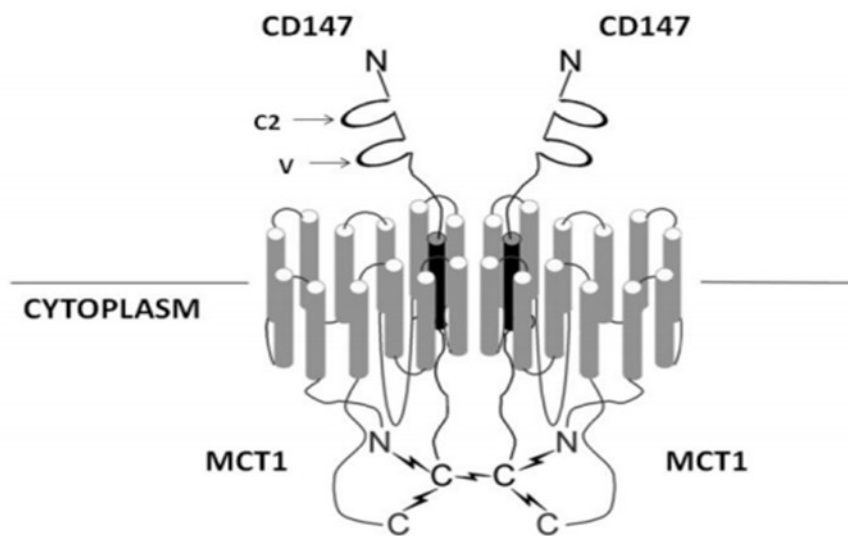
MCT1:een verrattuna, MCT4:llä on alhaisempi affiniteetti laktaatile ja pyruvaatile. K_m arvo on laktaatile 28 ja pyruvaatile 150mM. Korkean K_m -arvon avulla pyruvaatin konsentraatio voi olla solussa korkeampi, ja näin ollen sitä on tarpeeksi käytettävissä tarpeen tullen, esimerkiksi raskaan rasituksen aikana (Halestrap 2012).

2.4.4 Apuproteiini CD147

CD147 on yleinen glykoproteiini solukalvoilla. Proteiini tunnetaan myös nimellä OX-47, EMMPRIN, HT7 ja basigin. CD147-proteiini esiintyy monissa eri kudoksissa ja sillä on monia eri fysiologisia tehtäviä (Iacono ym. 2007). CD147 toimii apuproteiinina MCT1:lle ja MCT4:lle. Se voi myös toimia apuproteiinina MCT2:lle, ellei sen suosimaa apuproteiini embigiiniä ekspressoidu (Halestrap 2011).

CD147 koostuu rakenteellisesti kahdesta ekstrasellulaarisesta immunoglobuliininkaltaisesta osasta, intrasellularisesta hännästä, sekä transmembraanisesta osasta. Transmembraanisen osan keskellä on negatiivisesti varautunut aminohappo, mikä on epätavallista proteiinille, jolla on vain yksi transmembraaninen osa. Tavallisesti varautunut aminohappo löytyy proteiinista, jolla on useampi transmembraaninen osa. CD147- kaltaisista proteiineista tehdyt tutkimukset osoittavat, että transmembraaninen komponentti on erityisen tärkeä proteiinin liittyessä muihin transmembraanisiin proteiineihin (Kirk ym. 2000).

Solukalvolla CD147 ja MCT1 muodostavat aktiivisen tetrameerisen kuljettaja-kompleksin. Proteiinien transmembraaniset osat ja intrasellullaariset päät ovat yhteydessä toisiinsa (Koho ym. 2012) (kuva 4).



Kuva 4: MCT1 ja CD147 yhteinen kompleksi solukalvolla (Mykkänen A, Wilson ym. 2002)

2.5 Islanninhevoset

Hevoset tulivat Islannin saarelle norjalaisten uudisasukkaiden mukana, noin 900 vuosisadan alussa (Einarsson 2010). Viikingit, jotka arvostivat pientä ja vahvaa hevosta, yrittivät parantaa rotua risteyttämällä sitä ulkomailta tuoduilla hevosilla. Tuloksena oli epidemia, joka lähes tuhosi alkuperäisen hevoskannan. Sen jälkeen 1000-luvulla Alltingi (nykyaikaista islannin parlamenttia edeltävä kokous) kielsi laissa hevosten tuonnin ulkomailta. Laki on edelleen voimassa. Tämän

jälkeen rotu onkin pysynyt geneettisesti eristyksissä. Islannin saarelta lähtenyt hevonen ei voi myöskään koskaan palata kotimaahansa (islandssidan.se).

Vuonna 2001 tehdyissä tutkimuksissa todettiin, että islanninhevosten lähisukulainen on shetlanninponi. Norjalaiset, jotka valtasivat Shetlannin saaret, toivat todennäköisesti hevosia sieltä, koska matka Shetlannin saarilta Islantiin oli lyhyempi verrattuna Norjasta Islantiin (Einarsson 2010). Toisia lähisukulaisia ovat norjalaisalkuperärodot, Nordlandin tai Lyngen sekä vuonohevonen. Nämä alkuperäisrodut ovat taas vuorostaan sukua Mongolian alkuperäisrodulle (Einarsson 2010).

Vuonna 2003 tehdyssä tutkimuksessa tutkittiin eri hevosrotujen perimien etäisyyttä toisistaan mikrosatelliittien avulla. Tutkimuksessa todettiin, että etäisyys Mongolian alkuperäisrodun ja pohjois-Euroopan alkuperäisrotujen (norjalaiset rodut ja islanninhevoset) välillä oli lyhyempi verrattuna täysverisiin hevosrotuihin (Björnstad ym. 2003).

3 TUTKIMUSOSIO

3.1 Aineisto

Tutkimuksen aineisto koostuu 29 puhdasrotuisesta Suomessa asuvasta islanninhevosesta, joista tammoja oli 8kpl, ruunia 18 kpl ja yksi ori. Kahden hevosen sukupuolta ei ole tiedossa. Hevosten iät ja sukupuolet ovat oheisessa taulukossa (Taulukko 1).

sukupuoli	syntymäaika	ikä vuosina
ori	1986	24
ruuna	1984	26
ruuna	1989	21
ruuna	1991	19
ruuna	1992	18
ruuna	1993	17
ruuna	1993	17
ruuna	1995	15
ruuna	1997	13
ruuna	1999	11
ruuna	2000	10
ruuna	2000	10
ruuna	2001	9
ruuna	2001	9
ruuna	2003	7
ruuna	2004	6
ruuna	2006	4
ruuna		
tamma		
tamma		
tamma		
tamma	1997	13
tamma	1999	11
tamma	2001	9
tamma	2003	7
tamma	2003	7

TAULUKKO 1; Hevosten iät ja sukupuolet (4 hevosen syntymäajasta ei tietoa)

3.2 Näytteiden keräys ja käsittely

Verinäytteet otettiin omistajan luvalla 10 ml EDTA-verinäyteputkiin vena jugulariksesta. Näytteet kuljetettiin huonelämpötilassa laboratorioon, missä punasolut eroteltiin plasmasta sentrifugoimalla veriputkia 10 min 2000 x g. Punasolupuuropipetoitiin erilleen ja säilytettiin -80 °C lämpötilassa, kunnes analyysi aloitettiin.

3.3 Menetelmät

3.3.1 Punasolujen pesu ja membraanien (ghost) valmistus

Pakkasessa olleet punasoluputket sulatettiin jäällä. Punasolut (noin 1,5 ml) siirrettiin Beckman-putkiin ja lisättiin 30ml jääkylmää 5mM natriumfosfaattipuskuria. Putkia sentrifugoitiin 15 minuuttia 48 000g:ssä lämpötilan ollessa +4 °C. Sentrifugoinnin jälkeen suppi poistettiin.

Membraaneja pestiin n. 30 ml natriumfosfaattipuskurilla yhteensä neljä kertaa. Aina supin poiston jälkeen putken pohjalla oleva membraanimassa ja punasolunappi rikottiin varovaisesti pasteurpipetillä, jotta liuos olisi niin homogeeninen kuin mahdollista.

Viimeisen sentrifugoinnin jälkeen suppi poistettiin ja putkiin lisättiin 1 ml natriumfosfaattipuskuria. Pohjalle jäänyt nappi resuspensoitiin puskuriin ja siirrettiin eppendorffputkiin. Eppendorffputkia sentrifugoitiin 20 minuuttia 13 000 rpm +4 °C. Kirkas puskuri poistettiin putkista. Membraanit pakastettiin ja säilytettiin – 70 °C.

3.3.3 Proteiinipitoisuuden määrittäminen RBC membraaneista

Näytteet sulatettiin jäällä. Näytteet laimennettiin 1:50 PBS-puskurilla (fosfaattipuskuroitu fysiologinen NaCl-liuos). Reagenssia (BCA working reagent) lisättiin suhteessa 1:8 näytteeseen nähden. Tunnettuja standardeja (0, 0,25, 0,50 ja 0,75 µg) käytettiin standardisuoran aikaansaamiseksi. Näytteet pipetoitiin ELISA-levylle kolmena rinnakkaisnäytteenä. Voimakkaan

sekoituksen jälkeen levyä inkuboitiin 30 minuuttia 37 °C asteessa. Proteiinipitoisuus saatiin mittaamalla näytteiden absorbanssi Elisa lukijalla 562 nm aallonpituudella.

3.3.4 SDS-PAGE I. Polyakryyliamidi-geelielektroforeesi

Esivalmistelussa valmistettiin ajogeelit (yhteensä 6kpl). Alageelit valmistettiin sekoittamalla 15 ml tislattua vettä, 7,5 ml 1,5 M TrisHCl (pH 8,8) ja 7,5 ml bisakryyliamidia (40 %). Jähmettimiksi käytettiin 150 µl APS (ammoniumpersulfaatti) ja 15 µl TEMED (N,N,N',N'-tetrametyylietyleenidiamiini). Liuos pipetoitiin kahden lasilevyn väliin. Lasilevyt toimivat geelin muottina. Ylägeelit valettiin alageelin päälle ja Geelien yläreunaan asetettiin kammat, jotka muotoilevat näytettä varten kaivot. Päälle pipetoitiin vettä, jottei geeli pääsisi kuivumaan. Geelien jähmettyminen kesti yhteensä n. 45 minuuttia, jonka jälkeen niitä säilytettiin jääkaapissa seuraavan päivän ajoa varten.

Näyteputkiin lisättiin 2x Laemmlin näytepuskuria ja tislattua vettä, niin että tilavuus oli 100µl. Yhden näytteen kokonaisproteiinimäärä oli tällöin 10 µg. Näytteet ja proteiinipainostandardit pipetoitiin kaivoihin. Ylägeeli ajettiin 30 minuuttia 70 V jännitteessä, alageeli ajettiin 45 minuuttia 200 V jännitteessä (BioRad, Miniprotean II®, Hercules, Kalifornia, USA).

3.3.5 Blottaus, eli proteiinen siirto membraanille

Ennen siirtoa, membraanit tasapainotettiin 15 minuutin ajan blottauspuskurissa. Proteiinien siirtämiseksi membraanille pinottiin niin kutsuttu sandwich. Katodin puolelta alkaen alimmaiseksi laitettiin blottauspuskurissa kasteltu kuitutyyny, sen päälle suodatinpaperi, geeli, membraani, kostea suodatinpaperi sekä kuitutyyny. Geelin ja membraanin väliin ei saanut jäädä ilmaa. Sandwich asetettiin telineeseen ja nostettiin altaaseen, jossa oli jäähdytysblokki. Lopulta allas täytettiin kylmällä puskurilla. Proteiinit siirrettiin membraanille 100 V jännitteellä 90 minuutin ajan (BioRad, MiniTrans-Blot®).

3.3.6 Ponceau- värjäys

Membraanit värjättiin Ponceau-värillä (Ponceau-S, tilavuus -1% EtCOOH). Membraani upotettiin n. 30 sekunniksi väriliuokseen ja huuhdeltiin tislattulla vedellä. Tällä varmistettiin proteiinien tasainen siirtyminen geeliltä membraanille.

3.3.7 Blokkauk

Membraanit laitettiin lasimaljoihin ja kaadettiin blokkaukspuskuria päälle. Blokkaukspuskuri oli 20 g maitojauhetta 200 ml:ssa 0,1 %-Tween-TBS (100ml 10xTris-puskuroitu fysiologinen NaCl-liuos, 1 ml Tween, 900 ml MilliQ). Membraaneja inkuboitiin tunnin verran huoneenlämmössä. Vasta-aineliuos valmistettiin sekoittamalla 16 ml 10 % maitojauheliuosta ja 8 µl CD147-vastaaineliuosta (1:2000-laimennos). Membraanit asetettiin parafilmistä tehtyihin veneisiin ja jokaiselle membraanille pipetoitiin 4 ml vasta-aineliuosta. Membraaneja inkuboitiin yön yli +4 °C lämpötilassa. Vasta-ainekäsittelyn jälkeen membraaneja huuhdeltiin kahdesti TBST:llä, jonka jälkeen niitä pestiin ensin 15 minuutin ajan ja sen jälkeen kahdesti 5 minuutin ajan TBST:llä. Toisessa vasta-ainekäsittelyssä membraanit käsiteltiin Polyclonal/Goat anti-Rabbit Immunoglobulins/ HRP Dacocymation # PO448 laimennoksella 1:2000. Sekundäärivasta-aineen annettiin vaikuttaa tunnin ajan. Lopuksi membraanit pestiin samalla tavalla kuin primäärivasta-aineen jälkeen.

3.3.8 Strippaus

Samoja membraaneja käytettiin kaikkien proteiinien mittauksiin. Joka vasta-ainekäsittelyn jälkeen membraaneja stripattiin strippausliuoksessa (65 mM Tris, 2% SDS, 100 mM ME) +37 °C. Strippauksen jälkeen membraanit pestiin useampaan kertaan pesuliuoksella (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol). Pesun jälkeen membraanit laitettiin maitojauheesta tehtyyn blokkaukseen kahdeksi tunniksi. Blokkauksen jälkeen membraanit olivat valmiit seuraavaan vasta-ainemittaukseen.

3.3.9 Kuvantaminen

Membraaneja värjättiin tuikeliuoksella (PIERCE SuperSignal[®] West Dura Extended Duration Substrate, Pierce Biotechnology Inc., USA) 10 minuutin ajan. Värjäyksen jälkeen membraaneista valutettiin ylimääräinen neste, jonka jälkeen membraanit asetettiin muovitaskuun. Membraanien kemiluminesenssi kuvattiin (Bio-Rad GS-525 Molecular Imager, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, USA) 20 minuutin valotusajalla ja tulokset käsiteltiin MultiAnalyst-ohjelmalla (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, USA).

3.3.10 Statistiikka

Tulokset eivät asettuneet normaalijakaumaan, paitsi MCT2. Tuloksia tarkasteltiin nonparametrisella Spearmanin korrelaatiolla (MCT1 ja 2, MCT1 ja CD147, CD147 ja MCT2, ikä ja MCT1, ikä ja MCT2, ikä ja CD147) sekä t-testillä (sukupuoli ja MCT1, MCT2, CD147, ikä). Merkittävänä tuloksena pidettiin $P < 0.05$.

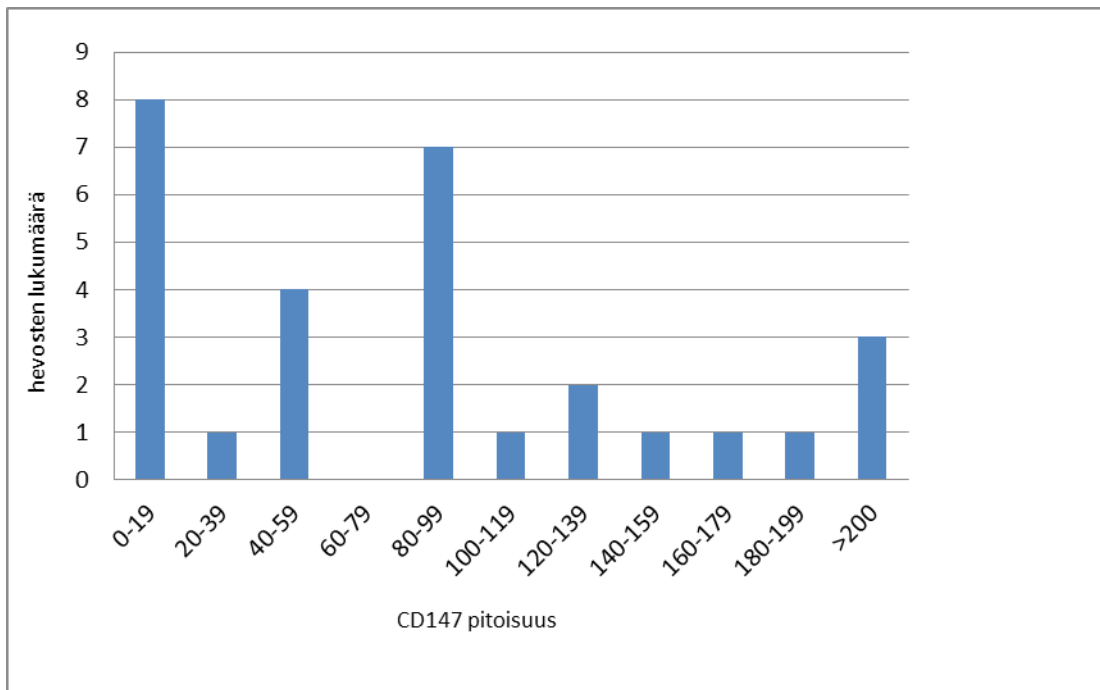
4 TULOKSET

CD147 oli jakautunut kaksihuippuisesti (Kuvaaja 1). 13 hevosella CD147 ilmentyminen oli niukkaa ja 16 hevosella runsasta. MCT1 ja MCT2 jakaumissa ei todettu selvää kaksihuippuisuutta (Kuvaajat 2 ja 3).

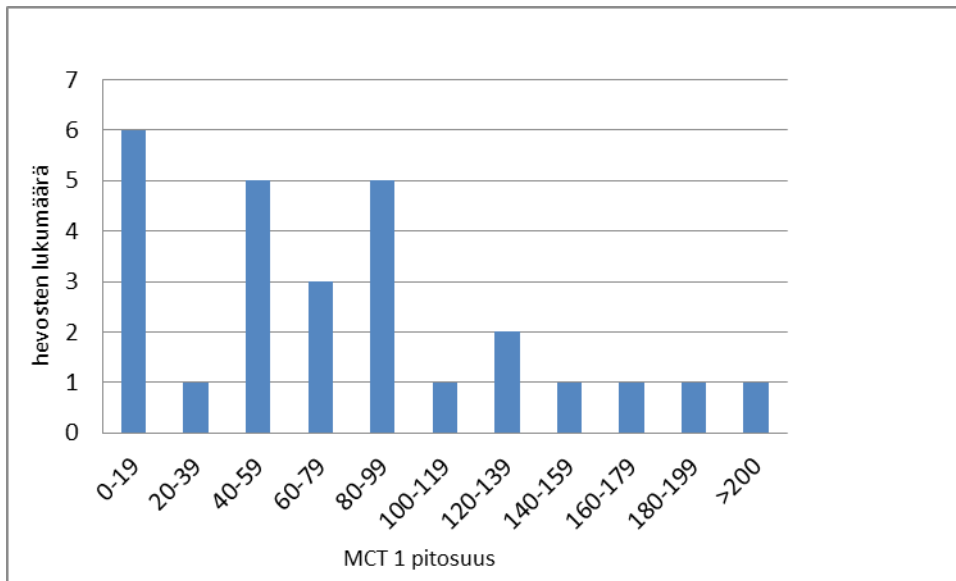
CD147 korreloi MCT-1-proteiiniin kanssa ($p < 0,001$), mutta ei MCT-2-proteiinin kanssa ($p > 0,02$). CD147 ja iän tai sukupuolen kanssa ei havaittu korrelaatiota (scatterkuva 1).

MCT-1 proteiinin kohdalla ei havaittu korrelaatiota iän tai sukupuolen kanssa.

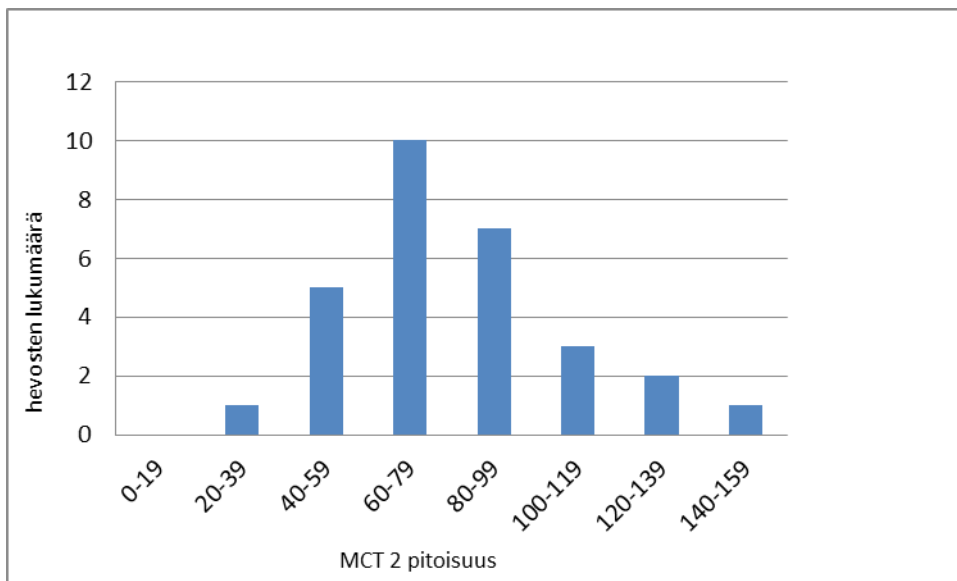
MCT-2 proteiinin kanssa havaittiin korrelaatio iän kanssa ($p < 0,021$), mutta ei sukupuolen kanssa (scatterkuva 2).



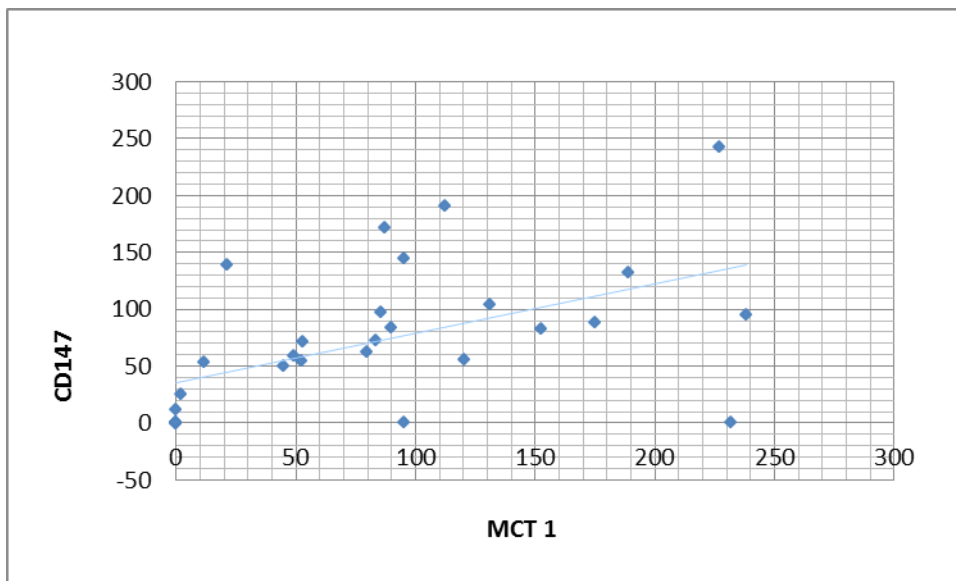
KUVAAJA 1; CD147-proteiinin määrä punasoluissa (suhteellinen yksikkö)



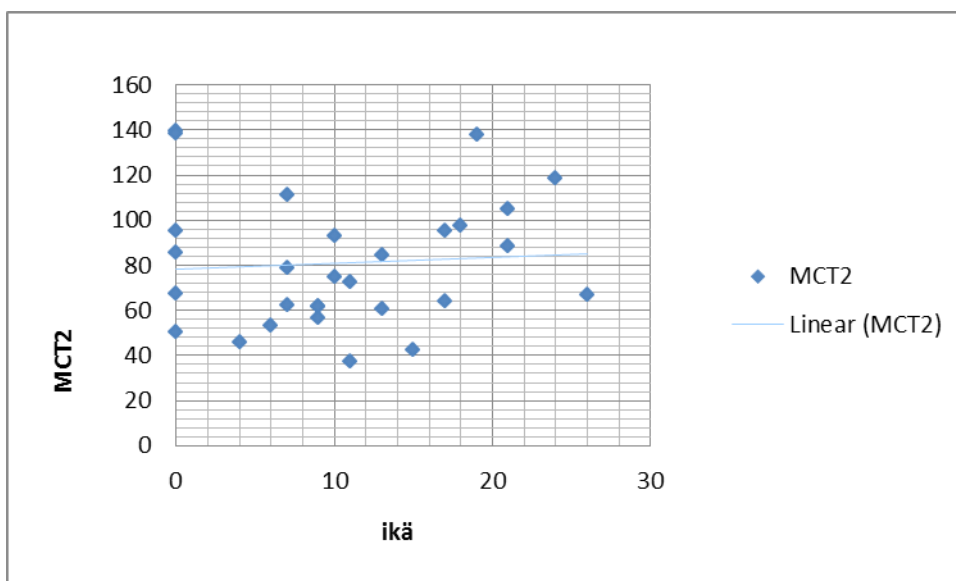
KUVAAJA 2; MCT1-proteiinin määrä punasoluissa (suhteellinen yksikkö)



KUVAAJA 3; MCT2-proteiinin määrä punasoluissa (suhteellinen yksikkö)



SCATTERKUVA 1: Korrelaatio CD147 ja MCT 1 välillä



SCATTERKUVA 2: Korrelaatio MCT2 ja iän välillä

4. POHDINTA

Aikisemmissä tutkimuksissa on selvitetty laktaattia kuljettavien proteiinien ilmentymistä punasoluissa kilpailevissa hevosroduissa kuten täysverisessä laukkahevosessa, lämminverisessä ravihevosessa ja suomenhevosessa. Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli saada tietoa islanninhevosten punasolujen laktaatinkuljetuksesta. Tuloksen avulla saa viitteitä siitä, milloin kuljetusproteiinia säätelevä geeni on muuttunut hevosilla kaksiporaiseksi. Muilla eläinlajeilla tämä ominaisuus on edelleen yksiporainen.

Islanninhevoset ovat tutkimusryhmänä mielenkiintoinen, koska rotu on pysynyt eristettynä Islannissa yli 1000 vuotta (Forsström 2003). Tämän tiedon avulla voi vetää johtopäätöksiä siitä, milloin laktaattikuljetusproteiinien säätelevät geenit ovat mutatoituneet tämpäpäiväiseen muotoonsa. Islanninhevoset ovat ominaisuudeltaan enemmän pitkäkestoisia ja sitkeitä kuin nopeita sprinttijuoksijoita. Ulkonäöltään ne muistuttavat enemmän kylmäverisiä kuin lämminverisiä.

Toisin kuin muilla roduilla, islanninhevosilla MCT1-proteiinin ilmentyminen ei noudattanut selkeää kaksihuippuista esiintymisjakautumaa. Suurimmalla osalla MCT1 esiintyi vähän tai ei ollenkaan, ja loppuilla sitä oli todettu eri pitoisuuksina (Kuvaaja 2). Sen sijaan CD147-proteiinin ilmentymisessä nähtiin kaksi ilmentymistasoa. 13 islanninhevosta ilmensi CD147-proteiinia vain vähän (Kuvaaja 1). Osuus on suurempi kuin muissa roduissa todetut (Mykkänen ym. 2010). Erityistä islanninhevosilla oli CD147 keskitason ryhmä. Tämä on muilla hevosroduilla harvinaista. Tähän ryhmään kuuluivat 14 % tutkituista islanninhevosista. MCT2-proteiinin pitoisuus oli normaalisti jakautunut, kuten muillakin tutkituilla hevosroduilla lukuun ottamatta lämminverisiä (Mykkänen ym. 2010).

Islanninhevosten punasolumembraaneilla laktaatinkuljettajia oli kokonaisuudessaan vähemmän kuin muilla hevosroduilla (Mykkänen ym. 2010). On mahdollista, että tämä on hyödyntänyt islanninhevosia karussa ympäristössä Islannin saarella. Olisi mielenkiintoista tutkia muita alkuperäisrotuja kuten esimerkiksi przewalskin hevosia, ja muita rotuja, jotka elävät vaativissa ympäristöissä, ja verrata tuloksia näiden kesken.

MCT1-proteiinin ja CD147-proteiinin välillä todettiin selkeä korrelaatio. Havainto ei ole yllättävä, sillä vastaava korrelaatio on löydetty myös aiemmissa tutkimuksissa ja CD147 tiedetään olevan MCT1 apuproteiini myös hevosella (Koho ym. 2006).

MCT2 proteiinin todettiin korreloivan iän kanssa. Vastaavaa ei ole todettu muilla hevosroduilla ja ilmiölle on vaikea löytää fysiologista selitystä. Todennäköisesti kyseessä on harha. Yhdellä islanninhevosella oli korkean iän lisäksi korkea pitoisuus MCT2-proteiinia. Pienellä ryhmällä tämä sattuma johtaa helposti harhaan. Havainnon todenperäisyys tulisikin tarkistaa tutkimalla isompi joukko islanninhevosia.

Suuri ikäero on tuskin muuten aiheuttanut tutkimuksessa harhoja tai virhetuloksia, koska ominaisuus on synnynnäinen, eikä muutu iän myötä (Mykkänen 2014, suullinen tiedonanto, Väihkönen ym. 2002).

Laktaatin kuljettajaproteiinin ekspressoitumisen ja sukupuolten välillä ei todettu korrelaatiota. Tämä erottaa myös islannin hevoset muista tutkituista roduista. Suomenhevostammoilla on enemmän MCT2 ja CD147 verrattuna ruuniin (Mykkänen ym. 2010). Myös lämminveritammoilla oli korkeampi laktaattikuljetusaktiivisuus verrattuna oriin. Tarkkaa syytä tähän tulokseen ei tiedetä, mutta on esitetty että sukupuolihormonit vaikuttavat hiilihydraattimetaboliaan, ja sen kautta myös laktaatinkuljetusaktiivisuuteen (Väihkönen ym. 1998).

Tutkimuksessa todettu vaihtelu MCT1- ja CD147-ilmentymistasossa viittaa siihen, että hevosen perimässä kaksiportaista laktaatinkuljetuskapasiteettia säätelevä tekijä on yli 1000 vuotta sitten tapahtunut geneettinen muutos, koska se oli todettavissa myös islanninhevosilla. Proteiinien määrä ei kuitenkaan ole jakautunut yhtä selkeän kaksihuippuisesti kuin muilla hevosroduilla tehden islanninhevosten maitohappokuljettajien ilmentymisen säätelystä omaleimaista.

Muissa tutkimuksissa oli tutkittu laktaatinkuljetusaktiivisuus sekä punasolumembraaneissa että lihasolujen membraaneissa. Tulosta oli myös verrattu suorituskyykyyn, esimerkiksi ravi- ja laukkahevosten tuloksiin. Täysveristen laukkahevosten laktaatinkuljetusaktiivisuus ei korreloinut kilpailutuloksien kanssa. Lämminveri- ja suomenhevosravureilla plasman ja veren laktaattipitoisuus oli osittain korreloinut suorituskyykyyn, ja siten epäsuorasti laktaattikuljetusaktiivisuuteen (Räsänen ym. 1995). Islanninhevosilla on tähän mennessä tutkittu vain punasolumembraanien laktaatinkuljetusaktiivisuutta. Olisi mielenkiintoista tutkia niillä myös lihasolujen

laktaatinkuljetusaktiivisuutta, koska lihasten laktaatinkuljetusaktiivisuudella on ehkä vielä isompi rooli suorituskykyyn ja kestävyYTEEN. Jos laktaatinkuljetus lihaksesta plasmaan on hidasta, lihas väsy nopeammin (Pösö ym. 2002). Islanninhevoset voivat toimia sprinttijuoksjoina töltilpailuissa (töltti on islanninhevosille ominainen viides askellaji), mutta niiden varsinainen vahvuus on kestävyys pitkäkestoisissa rasituksissa. Tämän voisi hyödyntää tutkimuksissa, joissa verrattaisiin lihasolujen laktaatinkuljetusaktiivisuutta niillä yksilöillä, jotka ovat hyviä sprinttijuoksioita ja niillä, jotka ovat hyviä pitkäkestoisissa rasituksissa. Tämä on tietysti hankala todellisuudessa tutkia, koska tuloksiin vaikuttavat myös monet muut asiat, kuten esimerkiksi tukielimistön muut ongelmat ja edut.

Tutkimuksen tulokset ovat saattaneet vääristyä, koska tutkittavat näytteet olivat tutkimuksen aikana sulaneet. Muutos lienee kuitenkin kaikissa näytteissä suunnilleen samanlainen.

Muita mahdollisesti tuloksia vääristäviä tekijöitä ovat otoksen pieni koko, sekä otoksen sukulaisuussuhteet keskenään.

6. KIITOKSET

Suuret kiitokset työn ohjaajalle Anna Mykkäselle innostavasta avusta ja pitkästä kärsivällisyydestä. Kiitokset myös Ninna Koholle asiantuntevista neuvoista. Kiitokset eläinlääketieteellisen tiedekunnan biokemian laboratorion henkilökunnalle suuresta avusta.

Kiitosket hevosen omistajille, jotka mahdollisti näytteiden saamisen.

Kiitokset Taru Kallinen-Moilaselle, joka antoi hyviä neuvoja tämän työn kesyttämisessä.

Lopuksi kiitokset kotini tukijoukoille, jotka ovat kannustaneet minua alusta loppuun saakka.

7. VIITTEET

Authier FJ. Revue des Maladies Respiratoires . [Classification of muscle cells], abstract. 2000 Jun;17(2 Pt 2):525-30

Bayly W M, Grant B D, Breeze R G, Kramer, J W. The effects of maximal exercise on acid–base balance and arterial blood gas tension in Thoroughbred horses. In Equine Exercise Physiology (ed. D. H. Snow., S. G. B. Persson and R. J. Rose), pp. 401–407. Cambridge: Granta Editions 1983.

Berg J, Tymoczko J, Stryer L. Biochemistry. Fifth edition. 2002 by W H Freeman and Company

Billeter R, Hoppeler H. Strength and Power in Sport. Blackwell Scientific publications, Oxford 1992 s.39-63

Bjørnstad G, Nilsenand NØ, Røed KH, Genetic relationship between Mongolian and Norwegian horses? Department of Morphology, Genetics and Aquatic Biology, The Norwegian School of Veterinary Science, Oslo, Norway

Forsström S. Islandshästar är inte som andra hästar. 2003

Garcia CK, Li X, Luna J, Francke U. cDNA cloning of MCT2, a second monocarboxylate transporter expressed in different cells than MCT1. J. Biol. Chem. (1995) 270: 1843-1849

Halestrap A, Price NT. REVIEW ARTICLE; The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family : structure, function and regulation. Biochem. J. (1999)343, 281±299.

Halestrap AP. Critical Review; The Monocarboxylate Transporter Family—Structure and Functional Characterization. Life, 64(1): 1–9, January 2012

Hogan MC, Richardson RS, Haseler LJ. Human muscle performance and PCr hydrolysis with varied inspired oxygen fractions: a ^{31}P -MRS study . Journal of Applied Physiology April 1, 1999 vol. 86 no. 4 1367-1373

Iacono KT, Brown AL, Greene MI, Saouaf SJ. CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology, Experimental and Molecular Pathology, December 2007, Pages 283–295

islandssidan.se, islandshästens historia, <http://www.islandssidan.se/islandshasten/hestur.htm>, hättu 3.4.2014

Jackson VN, Price NT, Carpenter L, Halestrap A. Cloning of the monocarboxylate transporter isoform MCT2 from rat testis provides evidence that expression in tissues is species-specific and may involve post transcriptional regulation. 1997. Biochem. J. 324: 447-453

Juel C. Regulation of pH in human skeletal muscle: adaptations to physical activity. Acta Physiology 193, 17-24

Juel C, Halestrap PA, Lactate transport in skeletal muscle — role and regulation of the monocarboxylate transporter, The Journal of Physiology, 517, 633-642, 1999

Kirk P, Wilson M C; CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression, the EMBO journal vol 19 No 15 pp 3896-3904, 2000

Koho NM, Mykkänen AK, Reeben M, Raekallio MR, M Ilves, Pösö AR, Sequence variations and two levels of MCT1 and CD147 expression in red blood cells and gluteus muscle of horses. Gene 491 (2012) 65–70.

Koho NM, Väihkönen L, Pösö AR. Lactate transport in red blood cells by monocarboxylate transporters. Equine exercise Physiology 6; 555-559, 2002

Koho NM, Hyyppä S, Pösö AR. Monocarboxylate transporters (MCT) as lactate carriers in equine muscle and red blood cells. Equine Vet Journal 36 354-358, 2006

Manoharan C, Wilson M C, the role of charged residues in the transmembrane helices of monocarboxylate transporters 1 and its ancillary protein basigin in determining plasma membrane expression and catalytic activity, Molecular membrane biology 2006: 23 (6) 486-498

McCullagh KJA, Poole RC, Halestrap AP, O'Brien M, Bonen M. Role of lactate transporter (MCT1) in skeletal muscles. American Physiological Society 1996.

Mykkänen AK, Pösö AR, McGovan CM, McKane SA. Expression of lactate transporters MCT1, MCT2 and CD147 in the red bloodcells of three horsebreeds: Finnhorse, Standardbred and Thoroughbred. Equine veterinary journal 2010.

Pösö AR Monocarboxylate transporters and lactate metabolism in equine athletes: a review, *acta vet scand* 2002 43, 63-74

Räsänen LA, Lampinen KJ, Pösö AR. Responses of blood and plasma lactate and plasma purine concentrations to maximal exercise and their relation to performance in standardbred trotters. *American Journal of Veterinary Research* 1995, 56(12):1651-1656.

Sahlin K, Harris RC, Nylinde B, Hultman E. Lactate content and pH in muscle obtained after dynamic exercise. *European journal of physiology*. 1976 Dec 28;367(2):143-9.

Skelton M S, Kremer D E, Smith E W, Gladden L B; Lactate influx into red blood cells of athletic and nonathletic species, *the American Physiological Society* 1995

Väihkönen L K, Pösö R, Interindividual variation in total and carrier-mediated lactate influx into red blood cells, *The American Journal of Physiology* 1998, R1025-R1030

Väihkönen L K, Heinonen O J, Hyypä S, Nieminen M, Pösö R, Lactate-transport activity in RBCs of trained and untrained individuals from four racing species, *The American Journal of Physiology* 2001, 281: R19-R24